

INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS DA *Lippia origanoides* H.B.K.(Verbanaceae) E SUAS POSSÍVEIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Roger Wallacy Guimarães Oliveira (bolsista do PIBIC/CNPq), Taciana Oliveira de Sousa (colaboradora, UFPI), Antonia Maria das Graças Lopes Citó (Orientadora, Departamento de Química – UFPI)

Introdução

A *Lippia origanoides* H.B.K. é um arbusto aromático de pequeno porte podendo chegar até 3 m de altura, nativa de alguns países da América Central e da região norte da América do Sul. Ela é também bastante encontrada na região Nordeste, especialmente no estado do Piauí. Na região piauiense onde é amplamente dispersa, a *L. origanóides* H.B.K. é conhecida como alecrim do campo e é comumente utilizada na medicina local no tratamento de uma série de patologias, tais como: gripe, resfriados e infecções pulmonares^{2,3}. Este trabalho teve como objetivo identificar a composição química e avaliar a atividade biológica das folhas através da partição líquido-líquido do extrato etanólico (EE) bruto da *L. origanóides* H.B.K. para a obtenção das Fr. hexânica (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e hidroalcolica (HA), além de fracionar por coluna seca e identificar a composição química por GC/EM da fração hexânica, quantificar o teor de fenóis e flavonóides totais, avaliar a atividade antioxidante frente aos métodos ABTS e DPPH e realizar a avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach.

Metodologia

O material vegetal (folhas) foi coletado no mês de julho de 2010, no município de José de Freitas, no estado do Piauí. As folhas passaram por um processo de secagem a temperatura ambiente e moídas fornecendo massa equivalente a 1120 g e macerada com 5X com EtOH na proporção 1:4 (m/v). O sobrenadante foi filtrado a cada 3 dias e o EE reunido foi concentrado em evaporador rotativo, liofilizado e pesado, obtendo-se o ext. etanólico bruto das folhas (EEBF). O processo de partição foi realizado em funil de separação de 1 L, na qual uma parte do EEBF foi suspenso em 450 mL EtOH/H₂O (1:1). A fase HA foi extraída com: 3 x 250 mL de Hex, 3 x 250 mL de DCM e 3 x 250 mL de AcOEt. Ao final desse processo, as fases orgânicas reunidas foram evaporadas, liofilizadas e pesadas.

A fr. Hex foi submetida a um fracionamento em coluna seca(CC). Aplicou-se 0,5 g da fração e usou-se como eluente Hex/AcOEt (8:2), quando o eluente atingiu a parte inferior da coluna, separou-se as subfrações, sendo obtidas 6. As subfrações H-1, H-2, H-3 e H-4 foram submetidas à análise por CG-EM e a identificação dos constituintes foi realizada por comparação dos espectros de massas com a biblioteca computacional Wiley229 e NIST 2.0 e com dados da literatura.

Os teores de fenóis totais(FT) dos extratos e frações foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações¹, os teores de flavonóides totais(FLAT) foi pelo método do cloreto de alumínio, determinado usando uma curva analítica de rutina.

A avaliação quantitativa do potencial antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, onde se realizou o monitoramento do consumo do radical livre

DPPH pelos extratos e frações num período de 30 minutos de reação ⁷ e o consumo do radical ABTS nos tempos de 1, 4 e 6 min.

O ensaio da toxicidade sobre *Artemia salina* Leach foi desenvolvido de acordo com a metodologia de Meyer et al., com modificações. As amostras submetidas ao bioensaio foram os extratos e frações das folhas da *L. origanoides* H.B.K. nas concentrações de 1000, 850, 700, 650 e 400 µg mL⁻¹. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

Resultados e Discussão

A maceração das folhas da *L. origanoides* forneceu a massa de 309,5 g de EE, com um rendimento de 27,6 %. A ordem crescente em relações ao rendimento das frações obtidas foi: Fr. HA < Fr. AcOEt < Fr. DCM < Fr. Hex e entre os extratos foi maior para o EE do que para o ext. HA. A diferença entre as massas de cada fração deve está relacionada com a acumulação fitoquímica de determinadas classes de metabólitos de polaridades diferenciadas.

Da Fr. Hex, após ser submetida à CC, foi possível identificar, por análise dos espectros, alguns de seus constituintes. Pelos resultados obtidos, constata-se que na subfração H-1 houve a predominância do Z-Cariofileno e (+)-δ-Cadineno, na subfração H-2 o Timol, Eucaliptol. A subfração H-3 apresentou como principal constituinte o Carvacrol, seguido do 3-tert-Butil-4-hidroxianisol e (±)-α-Tocoferol. O Fitol, e Lupeol foram os constituintes majoritários presentes na subfração H-4.

A Tabela 1 apresenta o resultado dos teores dos FT e FLAT dos extratos e frações

Tabela 1 – Teores de fenóis (FT) expressos em mg de equivalente de ácido gálico/g de material vegetal seco (MVS) e Teores de FLAT expressos em mg de equivalente de rutina/g de material vegetal seco (MVS).

FOLHAS DA PLANTA	FT mg de EAG/g MVS ± DP	FLAT mg de ER/g MVS ± DP
Ext. Etanólico	7,83 ± 0,11	6,07 ± 0,53
Fr. Hexânica	9,81 ± 0,36	3,36 ± 0,62
Fr. DMC	9,35 ± 0,35	2,23 ± 0,07
Fr. AcOEt	3,91 ± 0,04	4,97 ± 0,07
Fr. Hidroalcoólica	0,46 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Ext. Hidroalcoólico	23,98 ± 1,13	30,14 ± 0,21

média ± desvio padrão (DP)

Com base na classificação de Rufino et. al., (2010) o Ext. HA apresentou um teor de polifenóis médio, entretanto, as demais foram consideradas com baixo teor de FT, pois apresentaram teores menores que 10 mg de EAG / de MVS. Os teores de FLAT acumulados obtiveram variação de 0,19 ± 0,01 a 30,14 ± 0,21, seguindo a seguinte ordem entre as amostras: Ext. HA > Ext. Etanólico > Fr. AcOEt > Fr. Hex. > Fr. DCM > Fr. HA.

A fração que apresentou maior atividade antioxidante no ensaio de DPPH foi AcOEt, entretanto, na determinação de fenóis totais a fração DCM foi a que apresentou maior teor, indicando que a fração AcOEt apresenta, além de fenóis, outras substâncias com atividade antioxidante, fato este já relatado na literatura (SOUSA et al.,2007). A ordem crescente das amostras que apresentaram atividade antioxidante frente ao radical ABTS foi: Fração Hex. < Fr. AcOEt < Fr. DMC <

EE < Ext. HA < Fr. HA. As atividades obtidas pelas amostras de Fr. HA e Ext. HA apresentaram uma maior atividade em comparação com o padrão rotina em todos os tempos, com exceção do Ext. HA no tempo de 1 min.

As amostras da Fr. DMC e Fr. AcOEt apresentaram $DL_{50} = 380,59 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $29,98 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, logo como apresentaram DL_{50} menores do que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, são consideradas tóxicas ⁴. O EE e o Fr. Hex. foram também consideradas tóxicas quando testados frente a *A. salina*, devido ter matado todos os microcrustáceos presentes, em todas as concentrações.

Conclusão

No presente estudo concluiu-se que a Fr. Hex foi a que apresentou maior rendimento entre as frações obtidas, sendo que a mesma mostrou composição química rica em compostos com diversas atividades biológicas, e também apresentou substâncias comuns ao óleo essencial como o timol e carvacrol. Na determinação dos teores de fenóis totais, a Fr. DMC mostrou maior teor e a fração de AcOEt melhor atividade antioxidante, mostrando que não houve uma correlação direta entre fenóis totais e atividade antioxidante, o que evidencia a presença de outros substituintes não fenólicos com atividade antioxidante. Pelo método ABTS, as amostras com maior atividade antioxidante foram Fr. HA e ext. HA, apresentando atividade antioxidante maior que a rotina.

Na determinação da DL_{50} pelo bioteste com *A. salina*, as frações que apresentaram toxicidade contra esse microcrustáceo foram de DMC, AcOEt, Hex. e o EE, sugerindo que pode apresentar atividade antitumoral.

Apoio: Ao CNPq pela bolsa concedida a R. W. G. Oliveira.

Referências Bibliográficas

- 1 BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.6, p. 5195 - 5200, 2004.
- 2 CELIS, C. N.; RIVERO, P. E.; ISAZA M. J. H.; STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J. R.. **Scientia et Technica**. n. 33, p. 103-105, 2007.
- 3 FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro (RJ): Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.
- 4 MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 45, n. 31, 1982
- 5 OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- 6 RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.
- 7 SOUSA, C. M. M. S.; SILVA, H. R., VIEIRA-Jr., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C.L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M. BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

Palavras-chave: Atividades biológicas. Constituintes Químicos. *Lippia organoides* H.B.K..